

5 Diskussion

5.1 Pathogenität der entdeckten Mutation

Cotton und Scriver (1998) postulierten folgende Kriterien (hier fett hervorgehoben), anhand derer man zwischen einem benignem Polymorphismus und einer pathogenen Mutation unterscheiden kann. Als wichtigstes Kriterium bezeichnen sie den **Typ der Mutation**. Mutationen und Leserahmenverschiebungen, die ein Stopcodon generieren, führen in der Regel zu einem trunkierten Protein. Im Falle der libanesischen Familie handelt es sich um eine nonsense-Mutation, die ein Stopcodon an Position 597 generiert, wodurch 239 Aminosäuren vom C-Terminus des CLN3-Proteins verloren gehen. **Ein Gen sollte komplett analysiert werden und nicht nur ein spezifisches Exon, um die gefundene Mutation als pathogen einzustufen.** Ich habe das gesamte offene Leseraster des *CLN3*-Gens bei der libanesischen Familie (Stammbaum A) analysiert. Das gefundene Stopcodon liegt genau in dem Bereich des Gens, in dem auch die 1.02 kbp Deletion, die bei 81% der CLN3-Patienten ursächlich ist, lokalisiert ist. Cotton und Scriver postulieren weiterhin eine **Segregation des Genotyps mit dem Phänotyp innerhalb einer Familie**. Dies ist gegeben, da alle Patienten mit homozygoter Mutation erkrankt sind und kein heterozygoter Familienangehöriger Krankheitssymptome aufweist. Darüber hinaus konnte ich die Mutation sowohl auf der Ebene der genomischen DNA als auch auf cDNA-Ebene nachweisen. Die Restriktionsanalyse, als **zweite unabhängige Methode** bestätigte die Mutation ebenfalls. Somit erfüllt die neuentdeckte Mutation die Pathogenitätskriterien nach Cotton und Scriver (1998).

5.2 Mutationshotspots im *CLN3*-Gen

Ein Genregion wird als Mutationshotspot definiert, wenn die Anzahl der Mutationen in dem Bereich die Anzahl einer erwarteten Normalverteilung in allen Genregionen übersteigt. Hotspots sind in der Regel Bereiche mit wichtigen Aminosäuren in funktionellen Domänen eines Proteins (Walker et al. 1999).

Die meisten in der Literatur beschriebenen Mutationen im *CLN3*-Gen liegen im Bereich um die Exone 7 und 8. Im Exon 7 wurden drei nonsense-, eine splice-site und eine missense-Mutation beschrieben. Im Exon 8 finden sich sowohl eine missense-, zwei inser-

tions- und zwei nonsense-Mutationen und als auch eine Deletion. Die große 1,02 kbp Deletion überspannt beide Exone und reicht von Intron 6 bis Intron 8. Von den 31 bisher beschriebenen Mutationen im *CLN3*-Gen liegen 12 in oder in der Nähe dieser Exons. Somit kann man diese Region als Mutationshotspot bezeichnen. Ein Alignment der *CLN3*-Sequenzen verschiedener Spezies (Abb. 8) zeigt, dass die von Exon 7 und 8 kodierten Proteindomänen zwischen Mensch und Bierhefe hoch konserviert sind. Dies ist ein indirekter Hinweis darauf, dass es sich bei diesen Domänen um funktionell wichtige Anteile des Proteins handelt. Die funktionelle Relevanz dieser Genabschnitte kann man somit selbst dann postulieren, wenn die Funktion eines Proteins noch weitgehend unbekannt ist. Die neu entdeckte Stopmutation der libanesischen Familie scheint also in einer katalytisch wichtigen und hoch konservierten Region des *CLN3*-Gens zu liegen, wobei allerdings das am höchsten konservierte Proteinmotiv (WSSGTGGAG) nicht betroffen ist (Abb. 8).

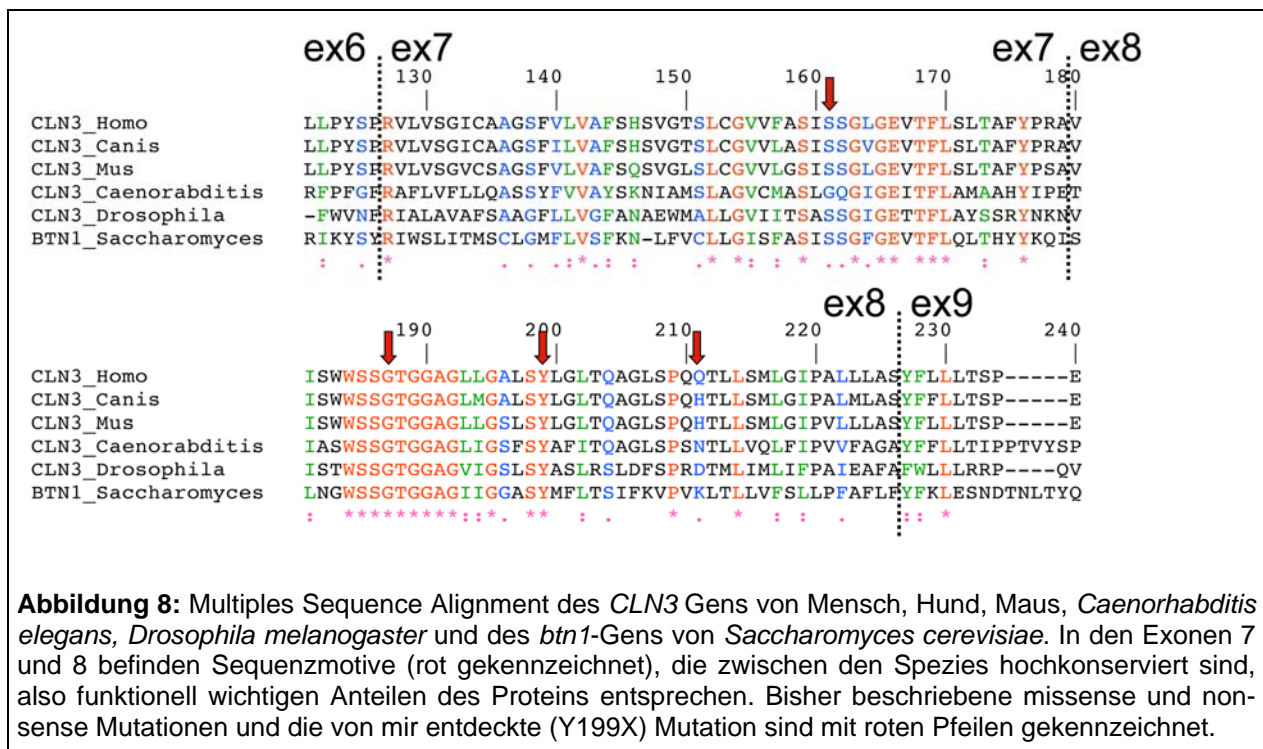


Abbildung 8: Multiples Sequence Alignment des *CLN3* Gens von Mensch, Hund, Maus, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* und des *btn1*-Gens von *Saccharomyces cerevisiae*. In den Exonen 7 und 8 befinden Sequenzmotive (rot gekennzeichnet), die zwischen den Spezies hochkonserviert sind, also funktionell wichtigen Anteilen des Proteins entsprechen. Bisher beschriebene missense und nonsense Mutationen und die von mir entdeckte (Y199X) Mutation sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet.

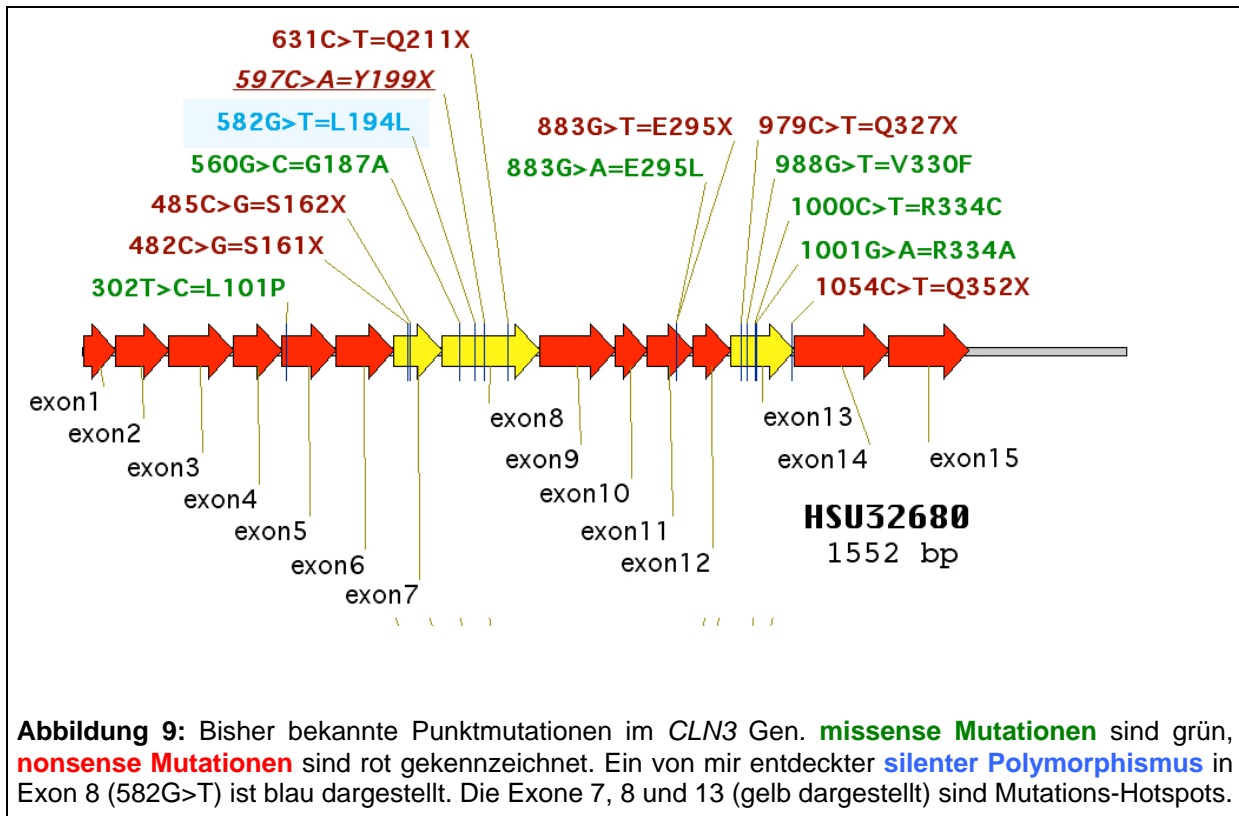


Abbildung 9: Bisher bekannte Punktmutationen im *CLN3* Gen. **missense Mutationen** sind grün, **nonsense Mutationen** sind rot gekennzeichnet. Ein von mir entdeckter **silenter Polymorphismus** in Exon 8 (582G>T) ist blau dargestellt. Die Exone 7, 8 und 13 (gelb dargestellt) sind Mutations-Hotspots.

5.3 Fehlender Nonsense Mediated Messenger Decay trotz Stopmutation

Nonsense mediated mRNA decay (NMD) repräsentiert einen phylogenetisch weit konservierten splicing- und translationsabhängigen Mechanismus, welcher Transkripte mit vorzeitigen Translationsstopcodons (*engl.* premature termination codons, PTCs) eliminiert, und so die Akkumulation C-Terminal trunkierter Peptide unterdrückt. NMD erfolgt im Rahmen der Qualitätskontrolle der Genexpression und sichert ein hohes Niveau der Genauigkeit (Maquat & Carmichael, 2001).

In der Regel tritt NMD dann auf, wenn die Stopmutation nicht im letzten Exon eines Gentranskripts oder in unmittelbarer Nähe einer Spleissstelle liegt (Hentze & Kulozik, 1999; Neu-Yilik et al., 2001). Dies ist aber bei der neu entdeckten Stopmutation (597C>A) nicht der Fall, weshalb auf cDNA-Ebene eigentlich ein NMD nachweisbar sein sollte. Ich konnte zeigen, dass dies aus bisher unbekanntem Gründen nicht der Fall ist. Die mRNA mit der Y199X Stopmutation wird in diesem Fall nicht von der Zelle als abnorm erkannt und könnte potentiell in ein trunkiertes Protein translatiert werden. Da dieses trunkierte Protein noch über die stark konservierten Proteindomänen bis Codon 1999 verfügen würde (siehe Abb. 8), könnte es noch eine gewisse katalytische Rest-

funktion aufweisen.

Auch im Falle der großen 1,02 kbp Deletion, die sich ca. 85% aller CLN3-Patienten nachweisen lässt, fand ich kein NMD (Abb. 7). Auch hier könnte ein trunkiertes Protein entstehen, welches aufgrund seiner Trunkierung hinter der Aminosäure an Position 154 allerdings die konservierten, durch die Exone 7 und 8 kodierten Domänen nicht mehr aufweisen würde. Zellbiologische Arbeiten mit künstlichen Expressionskonstrukten ohne die Exone 7 und 8 haben gezeigt, dass tatsächlich im Falle der 1,02 kbp Deletion ein trunkiertes Protein gebildet wird welches auch per Western blot nachweisbar war (Järvelä et al., 1999). Ähnliches wurde in einem knockout-Mausmodell gezeigt, welches die gleiche Exon 7-8 Deletion aufwies, wie man sie beim Menschen am häufigsten findet. Auch bei dieser Maus ließ sich im Western blot eine Bande nachweisen, die kürzer als das wildtyp Protein, aber mit anti-CLN3 Antikörpern darstellbar war (Cotman et al., 2002). Dies spricht dafür, dass auch in vivo das durch die Deletion trunkierte Protein nicht wesentlich abgebaut wird.

5.4 Genotyp-Phänotyp Relation bei Patienten mit CLN3

Die neu entdeckte Stopmutation hat eine vollständige Penetranz, d.h. alle homozygoten Träger der Mutation sind an CLN3 erkrankt (A.II:7-11). Sowohl die heterozygoten Träger der Stopmutation (A.I:1, 2, A.II:3-5) als auch die Familienmitglieder mit dem Wildtyp (A.II:1, 2) sind gesund.

Bei den erkrankten Familienmitgliedern (A.II:7-11) ist eine Homotypie zu erkennen. Das Erkrankungsalter und der Krankheitsverlauf sind bei allen Betroffenen der Familie ähnlich. Ebenso gleichen sie sich, im Gegensatz zu den Einzelpatienten mit der 1,02 kbp Deletion, in der milden Ausprägung ihrer CLN3-Erkrankung.

Es stellt sich nun die Frage, weshalb die Mitglieder der libanesischen Familie wesentlich milder betroffen sind als es dem „klassischen“ Verlauf der CLN3 entspräche. Da über die genaue biochemische Funktion des CLN3-Proteins nichts bekannt ist, kann ich hier nur spekulieren: Falls, wie es Voruntersuchungen (s.o.) nahe legen, in beiden Fällen ein trunkiertes Protein entstünde, wären im Falle der Y199X Mutation noch wesentliche konservierte Domänen des Proteins erhalten. Die in diesem Falle möglicherweise noch vorhandene katalytische Restaktivität könnte den Phänotyp abschwächen. Für diese

These spricht, dass Patienten mit einer Deletion der Exone 10-13, ebenfalls deutlich milder betroffen sind als Patienten mit der homozygoten 1,02 kbp Deletion (Lauronen et al., 1999). Die Patienten mit Deletion der Exone 10-13 würden, ebenso wie unsere Patienten aus der libanesischen Familie, noch über die konservierten Proteinmotive, welche durch die Exone 7 und 8 kodiert sind, verfügen.

Um einen schlüssigen Beweis dieser These zu führen, müsste man das trunkierte Protein hinsichtlich seiner katalytischen Restaktivität untersuchen. Hierzu benötigt man allerdings ein funktionelles Assay, welches zum jetzigen Zeitpunkt leider nicht zur Verfügung steht. Alternativ hätte man Komplementierungsstudien an btn-delta *Saccharomyces cerevisiae* Stämmen durchführen können (Pearce & Sherman, 1999), welche uns aber technisch nicht möglich waren.